

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ИНГИБИРОВАНИЯ ФЕРМЕНТА ПОЛИ
(АДФ-РИБОЗО) ПОЛИМЕРАЗЫ 1**

Т.А. Кургина

Научный руководитель: к.х.н. Р.О. Анарбаев

Новосибирский национальный исследовательский государственный университет

Россия, г.Новосибирск, ул. Пирогова 2, 630090

E-mail: t.a.kurgina@gmail.com

**DEVELOPMENT OF TEST-SYSTEM FOR THE ANALYSIS OF THE POLY (ADP-RIBOSE)
POLYMERASE 1 INHIBITION**

T.A. Kurgina

Scientific Supervisor: Dr. R.O. Anarbaev

Novosibirsk national research state university

Russia, Novosibirsk, Pirogova st., 2, 630090

E-mail: t.a.kurgina@gmail.com

Abstract. *The purpose of our work was to develop a test-system for studies of PARP1 inhibition in vitro. Earlier this test-system has been used to monitor the poly(ADP-ribosil)ation activity of PARP1. This system was tested for the study of the mechanism of PARP1 inhibition in real time. It was shown that this system can be used for investigating the PARP1 inhibition and the screening studies to find new PARP1 inhibitors.*

Введение. Одной из основных клеточных реакций, возникающей при повреждениях ДНК, является поли(АДФ-рибозил)ирование. Это посттрансляционная модификация различных белков, катализируемая ферментом поли(АДФ-рибоза)полимеразой 1 (PARP1). Данный фермент активируется при связывании с повреждением в ДНК, например, однонитевым разрывом. ДНК при этом выступает в роли кофактора. Используя в качестве субстрата NAD^+ , фермент синтезирует поли(АДФ-рибозу). Принято считать, что аутомодификация PARP1 приводит к диссоциации комплекса данного фермента с ДНК за счёт электростатического отталкивания, создаваемого отрицательно заряженным полимером поли(АДФ-рибозы) [1]. PARP1 и его активность важны для эксцизионной репарации оснований, транскрипции, образовании веретена деления, репарации двухнитевых разрывов [2]. Такое обилие функций и ведущая роль в репарации однонитевых разрывов делает данный фермент важной мишенью для создания противораковых препаратов. Терапевтический эффект ингибиторов PARP1 и других компонентов системы репарации основан на предотвращении восстановления ДНК раковых клеток после воздействия химиотерапевтическими агентами или ионизирующим излучением. Ингибиторы PARP1 повышают эффективность действия ДНК-алкилирующих агентов (например, темозоламида) и ингибиторов ДНК-топоизомеразы 1 (например, топотекана), а также ионизирующего излучения [3]. Ингибиторы PARP1 активно используются вместе с другими ДНК-повреждающими противоопухолевыми лекарствами, но могут осуществлять и прямое токсическое действие [4]. Однако, встречается так же и устойчивость опухолей к ингибиторам PARP1 [5].

Результаты клинического применения ингибиторов PARP1 прошлых поколений могут служить основой для продолжения поиска новых соединений, обладающих большей эффективностью. Важными являются и фундаментальные исследования, проясняющие механизмы взаимодействия PARP1 с различными компонентами систем, обеспечивающих стабильность генома. До настоящего времени не существовало методики изучения активности PARP1 в реальном времени, и все существующие методики основаны на определении количества образовавшейся поли(АДФ-рибозы) после остановки реакции. Подобный подход является трудоёмким, связан с большими затратами времени и делает затруднительным анализ механизмов ингибирования. Многие методы предполагают использование радиоактивной метки.

Целью работы являлась апробация представленной ранее тест-системы определения активности PARP1 в реальном времени для изучения ингибиторов данного фермента. Нами изучено *in vitro* действие препарата олапариб - ингибитора PARP1, уже применяемого в клинике [4].

Материалы и методы исследования. В работе использовались: рекомбинантный фермент PARP1, олапариб (Selleckchem) и двухцепочечный олигонуклеотид. Для исследования активности PARP1 использовался метод флуоресцентной спектроскопии. Для этого в качестве кофактора, активирующего PARP1, нами использовался короткий ДНК-дуплекс, содержащий одонитевой разрыв и флуорофор карбоксифлуоресцеин, присоединенный к 3' концу одной из цепей ДНК-дуплекса. Флуоресцентная метка позволяет детектировать активность PARP1 в реальном времени с помощью измерения анизотропии флуоресценции реакционной смеси. Анизотропия возрастает при связывании ДНК с белком. Таким образом, измеряя анизотропию, мы можем наблюдать связывание PARP1 с ДНК и его диссоциацию при поли(АДФ-рибозил)ировании.

С помощью разработанного нами метода мы изучили активность PARP1 на ДНК-дуплексе, содержащем одонитевой разрыв. Варьируя концентрацию фермента, мы определили величину константы диссоциации. Она составила 32 ± 3 нМ. Далее, определив зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации NAD^+ мы рассчитали Константу Михаэлиса ($K_M = 26 \pm 3$ мкМ). Затем данный метод был использован для изучения ингибирования PARP1 с помощью олапариба. Нами было изучено влияние данного препарата на связывание PARP1 с ДНК (рис.1.) и диссоциацию этого комплекса в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования (рис.2.).

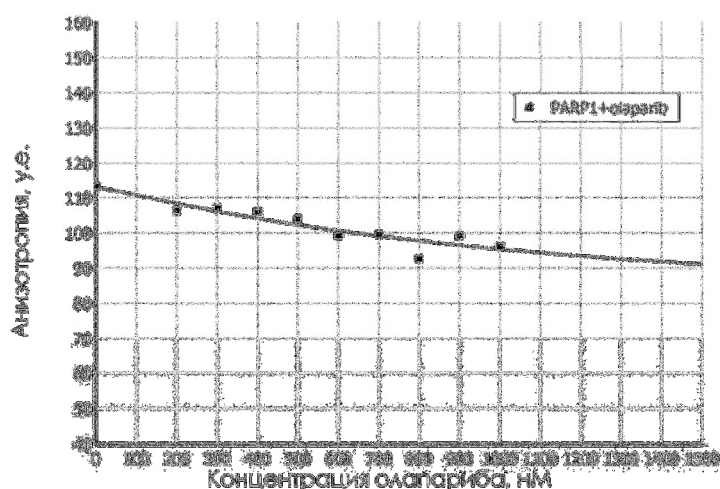


Рис.1. Влияние различных концентраций олапариба на связывание PARP1 с ДНК.

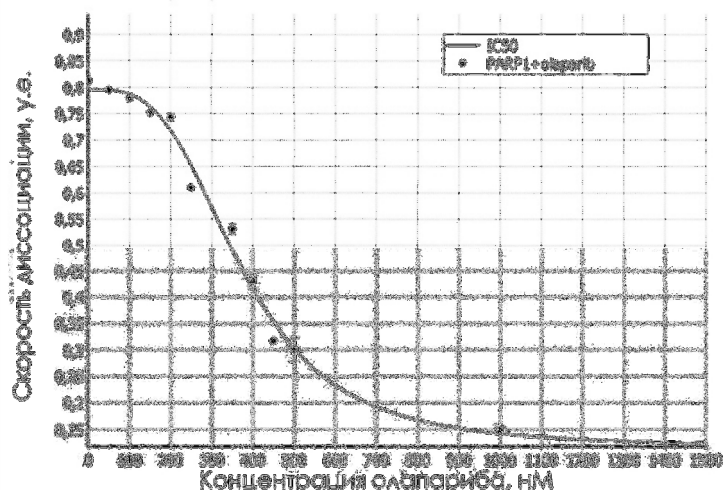


Рис.2. Влияние различных концентраций олапариба на скорость диссоциации PARP1 с ДНК.

Из рисунков видно, что олапариб практически не влияет на связывание PARP1 с ДНК, но значительно ингибирует процесс его диссоциации в процессе синтеза поли(АДФ-рибозы). В наших условиях константа ингибирования IC_{50} составляет 360 ± 14 нМ.

Выводы. Таким образом, нами показано, что разработанная тест-система для изучения активности PARP1 *in vitro* может применяться для быстрого скрининга ингибиторов данного фермента и изучения механизмов его ингибирования.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 14-24-00038 и программы СО РАН (III.2П.1) проект №1.1.1

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindahl T., Satoh M., Poirier G., Klungland A. Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks. Trends Biochem Sci, – 1995, N. 20, pp. 405–411.
2. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair. Mol Biol (Mosk), – 2016, N. 50(4), pp. 655-673.
3. Sonnenblick A. et al. An update on PARP inhibitors-moving to the adjuvant setting. Nat Rev Clin Oncol, – 2015, N. 12, pp. 27–41.
4. Kim G. et al. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy. Clin Cancer Res, , – 2015, N. 21(19), pp. 4257–4261.
5. Fojo T., Bates S. Mechanisms of resistance to PARP inhibitors--three and counting. Cancer Discov, , – 2013, N. 2, pp. 20–23.